

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> C12N 15/31, 15/60, 9/88 A61K 39/07, C12P 21/08 C12Q 1/68	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 90/04637 <b>(43) Date de publication internationale:</b> 3 mai 1990 (03.05.90)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR89/00556 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 25 octobre 1989 (25.10.89) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 88/13952 25 octobre 1988 (25.10.88) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR (FR/FR); 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> ESCUYER, Vincent (FR/FR); 5, avenue Blanche-de-Castille, F-78300 Poissy (FR). DUFLOT, Edith (FR/FR); 18, rue Pascal, F-94230 Cachan (FR). MOCK, Michèle (FR/FR); 6, rue du Cdt-Lamy, F-75011 Paris (FR). DANCHIN, Antoine (FR/FR); 60, rue de Reuilly, F-75012 Paris (FR).		<b>(74) Mandataire:</b> S.C. ERNEST GUTMANN-YVES PLASSE-RAUD; 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). <b>(81) Etats désignés:</b> DK, JP, US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> NUCLEOTIDE SEQUENCES EXPRESSING THE ADENYL CYCLASE OF <i>B. ANTHRACIS</i> <b>(54) Titre:</b> SEQUENCES DE NUCLEOTIDES EXPRIMANT L'ADENYL CYCLASE DE <i>B. ANTHRACIS</i> <b>(57) Abstract</b> <p>The nucleotide sequences comprise all or part of a sequence coding for an adenylyl cyclase such as that expressed by <i>B. anthracis</i>. The protein expressed can be used to develop molecular vaccines which offer protection against infections caused by <i>B. anthracis</i> and, if necessary, <i>B. pertussis</i> in humans and animals.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Les séquences de nucléotides comprennent tout ou partie d'une séquence codant pour une adényl cyclase telle qu'exprimée par <i>B. anthracis</i>. La protéine exprimée est utilisable pour l'élaboration de vaccins moléculaires à effet protecteurs vis-à-vis des infections dues à <i>B. anthracis</i> et le cas échéant <i>B. pertussis</i> chez l'homme et l'animal.</p> <p style="text-align: center;"><b>BEST AVAILABLE COPY</b></p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LJ	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'			US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MC	Monaco		

Séquences de nucléotides exprimant l'adényl cyclase de *B. anthracis*.

5 L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour une adényl cyclase telle qu'exprimée par Bacillus anthracis. Elle vise également les protéines correspondant à cette adényl cyclase et leurs applications biologiques.

10 B.anthraxis est une bactérie gram positif fortement pathogène pour l'homme et l'animal. Sa virulence résulte de la production d'une exotoxine à trois composants et d'une capsule d'acide poly-D-glutamique.

15 Les trois protéines consistent en un antigène protecteur (PA) de 85 kDa, un facteur léthal (LF) de 83 kDa et un facteur oedématogène (EF) de 89 kDa.

Ces protéines ne sont pas toxiques en elles-mêmes. Mais leur interaction provoque deux  
20 réponses pathologiques différentes chez l'animal.

Ainsi l'injection de PA avec LF provoque la mort tandis que l'injection intradermique de PA avec EF produit un oedème de la peau chez le cochon d'inde ou le lapin. Le composant EF qui est doté d'une activité  
25 adényl cyclase dépendante de la calmoduline, activateur eucaryote, induit une importante augmentation de la concentration en cAMP intracellulaire (AMP cyclique). On sait qu'une autre bactérie pathogène, à savoir Bordetella pertussis, produit également une adényl  
30 cyclase toxique, extracellulaire, activée par la calmoduline de l'hôte. Comme l'ont montré Mock et al (1), ces deux adényl cyclase sont antigéniquement reliées bien qu'elles soient produites par des organismes taxonomiquement totalement distincts.

35

Les gènes responsables de l'expression de PA, LF et EF sont présents sur le plasmide pX01 de B.anthraxis. Leur clonage moléculaire et leur expression chez E.coli a été rapportée par Vodkin et Leppla (2),  
5 pour PA, Robertson et Leppla (3) pour LF, et Tippetts et Robertson, (4) pour EF.

Mock et al (1) ont également rapporté un procédé de clonage et d'expression de l'adényl cyclase de B.anthraxis dans E.coli. Le procédé général de  
10 clonage fait l'objet de la demande FR 87/10614 du 24 juillet 1987 aux noms des demandeurs. Brièvement, on utilise selon ce procédé l'interaction adényl cyclase-calmoduline qui se traduit par la production de cAMP. Le clonage du gène est effectué dans une souche  
15 réceptrice déficiente en adényl cyclase, portant un plasmide exprimant de hauts niveaux de calmoduline. Les gènes qui coopèrent dans le procédé de clonage, à savoir celui qui code pour l'adényl cyclase et celui qui code pour la calmoduline, sont d'origine différentes.

20 En poursuivant leurs travaux dans ce domaine, les inventeurs ont réussi à déterminer la séquence portant l'information requise pour l'expression d'au moins la partie active d'une adényl cyclase telle qu'exprimée par B.anthraxis.

25 Cette étape a permis de définir la structure du gène, ses particularités ainsi que les similitudes éventuelles avec d'autres gènes. La conduite de ces travaux a également permis de déterminer la structure primaire de la toxine exprimée et de la  
30 comparer à la structure de toxines similaires telles que sécrétées par exemple par B.pertussis.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides capables de coder pour des protéines à activité adényl cyclase telle  
35 qu'exprimée par B.anthraxis.

3

Elle a également pour but de fournir au moins la partie active, par rapport à une activité adényl cyclase, de ces protéines.

L'invention vise en outre à fournir des vaccins moléculaires renfermant tout ou partie de  
5 séquences immunoprotectrices de l'adényl cyclase.

La séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle est constituée par au moins une partie d'une séquence codant pour une  
10 protéine à activité adényl cyclase telle qu'exprimée par B.anthraxis.

Cette séquence est capable de s'hybrider avec des gènes codant pour une protéine à activité adényl cyclase de B.anthraxis.

L'invention concerne également une  
15 séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle porte l'information pour l'expression d'une adényl cyclase, ou de fragments de cette dernière, capables de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés  
20 respectivement contre une adényl cyclase de B.anthraxis, de B.pertussis ou de cerveau de rat ou contre des fragments d'une telle adényl cyclase.

L'invention concerne également une séquence recombinante comprenant l'une des séquences  
25 définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence d'ADN codant pour des séquences de terminaison de la transcription et des signaux de traduction et de sécrétion.

Elle vise encore une séquence de nucléo-  
30 tides recombinante, associée à un promoteur et à un opérateur permettant de contrôler la transcription, et à une séquence signal permettant la sécrétion de la protéine dans l'espace périplasmique (gram -) ou dans le  
35 milieu extérieur.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4

Selon encore un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est capable de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence présentant l'enchaînement de nucléotides (I) suivant, qui correspond dans sa totalité au gène cya de B.anthraxis :

10

15

20

25

30

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

35

5  
1a

GAATTCAAAA TCGGACTTAG AAATACACAT ATAGAAATAA ACAACCTAAT CCATGTCAC  
-400  
GTACCGTTTT TTTACTAAAT AAACGAAATC AGTGTAAAAA TGAACAGCTG AACTTTATCA  
ACTTAGAATC TCTTTTTTTA CTTTAAATGC CTAGCTGTTT TTTCTAATGT TTGTATTCT  
-300  
AAATATATTT AAATATGAAT TGTAGCTGTG TGCCAAGAGT TATAATTAAT TTAAATAAGA  
TTATATTTGT AAATAAAATT GTAATTAAAC ATGTAGAATA AAGAGATTTT TAGTTTTATT  
-200  
AACAGGATGA AAATCCATAA AACCGTAAAT GTGATTCTTA AATTAGTTTA AAATAAAAA  
-100  
CAAGGATTTG CTCAGACTTG AGATGAATAT CTAAATATCA AGAACCCAAA GGAGGTTTAA  
GAATGACTAG AAATAAATTT ATACCTAATA AGTTTAGTAT TATATCCTTT TCAGTATTAC  
20  
TATTTGCTAT ATCCTCCTCA CAGGCTATAG AAGTAAATGC TATGAATGAA CATTACACTG  
40 100  
AGAGTGATAT TAAAAGAAAC CATAAACTG AAAAAAATAA AACTGAAAAA GAAAAATTA  
60  
AAGACAGTAT TAATAACTTA GTTAAACAG AATTTACCAA TGAACTTTA GATAAATAC  
80 200  
AGCAGACACA AGACTTATTA AAAAGATAC CTAAGGATGT ACTTGAAAT TATAGTGAAT  
100  
TAGGAGGAGA AATCTATTTT ACAGATATAG ATTTAGTAGA ACATAAGGAG TTACAAGATT  
120 300  
TAAGTGAAGA AGAGAAAAAT AGTATGAATA GTAGAGGTGA AAAAGTTCCG TTGTCATCCC  
140 400  
GTTTTGTATT TGAAAAGAAA AGGGAAACAC CTAAATTAAT TATAAATATC AAAGATTATG  
160  
CAATTAATAG TGAACAAAGT AAAGAAGTAT ATTATGAAAT TGGAAAGGGG ATTTCTCTTG  
180 500  
ATATTATAAG TAAGGATAAA TCTCTAGATC CAGAGTTTTT AAATTTAATT AAGAGTTTAA  
200  
GCGATGATAG TGATAGTAGC GACCTTTTAT TTAGTCAAAA ATTTAAAGAG AAGCTAGAAT  
220 600  
TGAATAATAA AAGTATAGAT ATAAATTTA TAAAAGAAA TTAACTGAA TTTCAGCATG  
240 700  
CGTTTTCTTT AGCGTTTTCT TATTATTTTG CACCTGACCA TAGAACGGTA TTAGAGTTAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

260 6  
1b  
 ATGCCCCCGA CATGTTTGAG TATATGAATA AGTTAGAAAA AGGGGGATT T GAGAAAATAA  
 280 800  
 GTGAAAGTTT GAAGAAAGAA GGTGTGGAAA AAGATAGGAT TGATGTGCTG AAAGGAGAAA  
 300  
 AAGCACTTAA AGCTTCAGGT TTAGTACCAG AACATGCAGA TGCTTTTAAA AAAATTGCTA  
 320 900  
 GAGAATTAAA TACATATATT CTTTTTAGGC CTGTTAATAA GTTAGCTACA AACCTTATTA  
 340 1000  
 AAAGTGGTGT GGCTACAAAG GGATTGAATG TTCATGGAAA GAGTTCGGAT TSGGGCCCTG  
 360  
 TAGCTGGATA CATACCATT GATCAAGATT TATCTAAGAA GCATGGTCAA CAATTAGCTG  
 380 1100  
 TCGAGAAAGG AAATTTAGAA AATAAAAAAT CAATTACAGA GCATGAAGGT GAAATAGGTA  
 400  
 AAATACCATT AAAGTTAGAC CATTTAAGAA TAGAAGAGTT AAAGGAAAAT GGGATAATTT  
 420 1200  
 TGAAGGGTAA AAAAGAAATT GATAATGGTA AAAAATATTA TTTGTTAGAA TCGAATAATC  
 440 1300  
 AGGTATATGA ATTTAGAATT AGCGATGAAA ACAACGAAGT ACAATACAAG ACAAAGAAG  
 460  
 GTAAAATTAC TGTTTTAGGG GAAAATTCA ATTGGAGAAA TATAGAAGTG ATGGCTAAAA  
 480 1400  
 ATGTAGAAGG GGTCTGAAG CCGTTAACAG CTGACTATGA TTTATTTGCA CTTGCCCCAA  
 500  
 GTTTAACAGA AATAAAAAA CAAATACCAC AAAAAGAATG GGATAAAGTA GTTAACACCC  
 520 1500  
 CAAATTCATT AGAAAAGCAA AAAGGTCTTA CTAATTTATT GATTAAATAT GGAATTGAGA  
 540 1600  
 GGAAACCGGA TTCAACTAAG GGAACCTTAT CAAATTGGCA AAAACAAATG CTTGATCGTT  
 560  
 TGAATGAAGC AGTCAAATAT ACAGGATATA CAGGGGGGGA TGTGGTTAAC CATGGCACAG  
 580 1700  
 AGCAAGATAA TGAAGAGTTT CCTGAAAAAG ATAACGAAAT TTTTATAATT AATCCAGAAG  
 600  
 GTGAATTTAT ATTAATAA AATTGGGAGA TGACAGGTAG ATTTATAGAA AAAACATTA  
 620 1800  
 CGGGAAAAGA TTATTTATAT TATTTTAACC GTTCTTATAA TAAATAGCT CCTGGTAATA  
 640 1900  
 AAGCTTATAT TGAGTGGACT GATCCGATTA CAAAAGCCAA AATAAATACC ATCCCTACGT

FEUILLE DE REMPLACEMENT



7  
lc

660 CAGCAGAGTT TATAAAAAAC TTATCCAGTA TCAGAAGATC TTCAAATGTA GGAGTTTATA  
2000

680 AAGATAGTGG CGACAAAGAC GAATTTGCAA AAAAAGAAAG CGTGAAAAAA ATTGCAGGAT

700 ATTTGTCAGA CTATTACAAT TCAGCAAATC ATATTTTTTC TCAGGAAAAA AAGCGTAAAA  
2100

720 TATCAATATT TCGTGGAATC CAAGCCTATA ATGAAATTGA AAATGTTCTA AAATCTAAAC  
2200

740 AAATAGCACC AGAATACAAA AATTATTTTC AATATTTAAA GGAAAGGATT ACCAATCAAG

760 TTCAATTGCT TCTAACACAT CAAAAATCTA ATATTGAATT TAAATTATTG TATAAACAAT  
2300

780 TAAACTTTAC AGAAAATGAA ACGGATAATT TTGAGGTCTT CAAAAAATT ATTGATGAAA

800 AATAAATATA TATAATTGTT TTTCTGAAAA TTCATCATTT TAAAGAAGAC ACTAGGAATT  
2400

AAATAGATGT ATTGAATAGT TATAGTAATG GTCTTGTATG GACATACCGC TTATACTTTG  
2500

GGAGGTAGTA GATATTAAAC AACATATAGC AAATGAACTG GATGTAGATC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ou l'enchaînement des nucléotides complémentaires de la séquence (I).

Des séquences selon l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus ou sont constituées par tout ou  
5 partie de cet enchaînement.

La séquence en aval du site de liaison aux ribosomes est caractérisée en ce qu'elle est particulièrement riche en A-T.

10 Il va de soi que les bases de la séquence de nucléotides considérée peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées, dès lors qu'une sonde élaborée à partir d'une telle séquence  
15 donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour une adényl cyclase telle que secrétée par B.anthraxis.

Toute séquence de nucléotides hybridable  
20 avec celle de l'enchaînement (I), telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique, entre également dans le cadre de l'invention.

La séquence de nucléotides de l'invention  
25 correspond encore, selon le code génétique universel, à au moins une partie de la séquence (II) en acides aminés suivantes :

30

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

M T R N K F I P N K F S I I S F S V L  
20 L F A I S S S Q A I E V N A N N E H Y T  
40 E S D I K R N H K T E K N K T E K E K F  
60 K D S I N N L V K T E F T N E T L D K I  
80 Q Q T Q D L L K K I P K D V L E I Y S E  
100 L G G E I Y F T D I D L V E H K E L Q D  
120 L S E E E K N S M N S R G E K V P F A S  
140 R F V F E K K R E T P K L I I N I K D Y  
160 A I N S E Q S K E V Y Y E I G K G I S L  
180 D I I S K D K S L D P E F L N L I K S L  
200 S D D S D S S D L L F S Q K F K E K L E

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10

Iib

220 L N N K S I D I N F I K E N L T E F Q H  
240 A F S L A F S Y Y F A P D H R T V L E L  
260 Y A P D M F E Y M N K L E K G G F E K I  
280 S E S L K K E G V E K D R I D V L K G E  
300 K A L K A S G L V P E H A D A F K K I A  
320 R E L N T Y I L F R P V N K L A T N L I  
340 K S G V A T K G L N V H G K S S D W G P  
360 V A G Y I P F D Q D L S K K H G Q Q L A  
380 V E K G N L E N K K S I T E H E G E I G  
400 K I P L K L D H L R I E E L K E N G I I  
420 L K G K K E I D N G K K Y Y L L E S N N  
440 Q V Y E F R I S D E N N E V Q Y K T K E  
460 G K I T V L G E K F N W R N I E V M A K  
480 N V E G V L K P L T A D Y D L F A L A P  
500 S L T E I K K Q I P Q K E W D K V V N T

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

11

IIC

520 P N S L E K Q K G L T N L L I K Y G I E  
540 R K P D S T K G T L S N W Q K Q M L D R  
560 L N E A V K Y T G Y T G G D V V N H G T  
580 E Q D N E E F P E K D N E I F I I N P E  
600 G E F I L T K N W E M T G R F I E K N I  
620 T G K D Y L Y Y F N R S Y N K I A P G N  
640 K A Y I E W T D P I T K A K I N T I P T  
660 S A E F I K N L S S I R R S S N V G V Y  
680 K D S G D K D E F A K K E S V K K I A G  
700 Y L S D Y Y N S A N H I F S Q E K K R K  
720 I S I F R G I Q A Y N E I E N V L K S K  
740 Q I A P E Y K N Y F Q Y L K E R I T N Q  
760 V Q L L L T H Q K S N I E F K L L Y K Q  
780 L N F T E N E T D N F E V F Q K I I D E  
800 K

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Les lettres indiquées dans cet enchaînement présentent les significations conventionnelles suivantes :

	D	Acide aspartique
5	E	Acide glutamique
	A	Alanine
	R	Arginine
	N	Asparagine
	C	Cystéine
10	Q	Glutamine
	G	Glycine
	H	Histidine
	I	Isoleucine
	L	Leucine
15	K	Lysine
	M	Méthionine
	F	Phenylalanine
	P	Proline
	S	Sérine
20	T	Thréonine
	W	Tryptophane
	Y	Tyrosine
	V	Valine

25 L'invention vise en outre une protéine à activité adényl cyclase du type de celle synthétisée par B.anthraxis, ainsi que les fragments peptidiques de cette protéine, correspondant selon le code génétique universel à l'une des séquences de nucléotides  
30 ci-dessus.

La protéine selon l'invention est telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant contenant une séquence de nucléotides comme définie plus haut sous le contrôle  
35 d'éléments de régulation permettant l'expression de

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ladite séquence dans la cellule hôte, mise en culture dans un milieu approprié des cellules hôtes transformées et récupération de la protéine à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture lorsqu'elle est sécrétée.

5 L'invention vise plus spécialement une protéine correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (I) de nucléotides et qui est représentée par l'enchaînement (II) de 800 acides aminés. Cette protéine possède un poids moléculaire théorique  $M_r$  de 92 387. Comme d'autres protéines extracellulaires d'organismes gram positifs, l'adényl cyclase apparaît synthétisée par B.anthraxis sous forme d'un plus grand précurseur dont la séquence signal est éliminée lors de la sécrétion. Le début de la séquence devrait occuper la position 29 ou pourrait occuper la position 34. La composition globale après élimination de la séquence du précurseur correspond à une protéine hydrophile. Des résidus basiques ainsi que des acides aminés hydrophobes sont proches de la partie N-terminale comme caractéristiques d'un peptide signal. On peut substituer à cet enchaînement signal d'autres peptides signaux, en particulier pour améliorer la sécrétion de l'adényl cyclase dans d'autres organismes.

20 On notera que l'adényl cyclase ci-dessus, comme celle exprimée par B.pertussis, ne contient pas de résidus cystéine, ce qui contraste avec les observations biochimiques effectuées sur les cyclases eucaryotes.

25 L'étude de cette séquence de 800 acides aminés montre qu'elle présente plusieurs régions communes avec l'adényl cyclase sécrétée par B.pertussis de 1706 acides aminés, comme développé dans la partie de la description illustrant plus en détail l'invention.

30 Selon un autre aspect de l'invention, la protéine de l'invention à activité adényl cyclase donne

FEUILLE DE REMPLACEMENT

lieu à une réaction immunologique croisée avec des anticorps dirigés contre des sous-unités catalytiques d'adényl cyclase de cerveau de rat ou encore contre l'adényl cyclase de B. pertussis.

5 La protéine de l'invention et ses fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

10 De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement la protéine ci-dessus et ses fragments sont également visés par l'invention.

15 Les séquences de nucléotides selon l'invention sont obtenues avantageusement selon le procédé de clonage des demandeurs évoqué plus haut. Les vecteurs recombinants d'expression et de clonage capables de transformer une cellule hôte appropriée entrent également dans le cadre de l'invention. Ces  
20 vecteurs comportent au moins une partie d'une séquence de nucléotides de l'invention sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression. Les souches de microorganismes transformées font également partie de l'invention. Ces souches comportent l'une des  
25 séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

L'invention vise également les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux  
30 ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques de l'enchaînement (I), de sondes pour la détection de séquences similaires dans les gènes produisant des  
35 adényl cyclases. Cette élaboration comprend, notamment,



15

la dénaturation des séquences double brin pour obtenir une séquence monobrin utilisable en tant que sonde.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie  
5 ci-dessus, plus spécialement un fragment intragénique codant pour le site catalytique de liaison à la calmoduline ou de manière suffisamment spécifique pour une partie de ce site, dans les adényl cyclases bactérienne. De tels fragments, complémentaires des  
10 sites correspondants dans les gènes d'eucaryotes exprimant de l'adényl cyclase à activité dépendante de la calmoduline, présentent en particulier l'avantage de faciliter le clonage et l'analyse des gènes en question.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde  
15 comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

Des sondes appropriées pour ce type de  
20 détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif (sondes chaudes) ou tout autre groupe non radio-actif (sondes froides) permettant la reconnaissance de la sonde à l'état hybridé avec la préparation renfermant l'ADN à étudier.

Selon les techniques classiques, ces  
25 sondes sont mises en contact avec un échantillon biologique renfermant des bactéries, ou directement avec ces bactéries ou leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la  
30 séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit testé.

On peut, par exemple, mettre en oeuvre la  
méthode d'hybridation sur taches. Cette méthode comporte  
35 après dénaturation de l'ADN préalablement obtenu à

FEUILLE DE REMPLACEMENT

partir de cellules exprimant de l'adényl cyclase, le dépôt d'une quantité aliquote de cet ADN sur des membranes de nitrocellulose, l'hybridation de chaque membrane dans les conditions usuelles avec la sonde et la détection, de manière classique, de l'hybride formé.

On peut aussi utiliser une méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Cette méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADNs par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles. Il n'est pas toujours nécessaire de procéder à l'expression préalable de l'ADN. Il suffit que l'ADN soit rendu accessible à la sonde.

L'invention fournit ainsi des outils permettant de détecter rapidement, avec une grande spécificité, des séquences similaires dans les gènes codant pour des adényl cyclases, ce qui permet d'étudier l'origine et le mode d'action de ces adényl cyclases.

Pour la mise en oeuvre des méthodes de détection considérées ci-dessus basées sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,
- avantageusement, un milieu approprié respectivement à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde,
- avantageusement des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

L'invention vise également les applic-

FEUILLE DE REMPLACEMENT

tions immunologiques des protéines définies ci-dessus, plus spécialement pour l'élaboration d'antisérums spécifiques ainsi que d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont formés selon les techniques classiques par injection de la protéine à des animaux, récupération des antisérums, puis des anticorps à partir des antisérums par exemple par chromatographie d'affinité.

Les anticorps monoclonaux sont produits de manière habituelle en fusionnant des cellules de myélomes avec des cellules de rate d'animaux préalablement immunisés à l'aide des protéines de l'invention.

Les essais de toxicologie réalisés avec l'adényl cyclase en l'absence d'antigène protecteur ont démontré leur absence de toxicité.

Tout ou partie des séquences immunoprotectrices de ces protéines sont avantageusement utilisées pour l'élaboration de vaccins sous réserve de ne pas donner lieu à des réactions immunitaires indésirables mettant en jeu par exemple l'adényl cyclase de l'hôte.

L'invention vise donc des vaccins moléculaires capables de prévenir les infections provoquées par B.anthraxis et ses effets toxiques chez l'homme et l'animal, ces vaccins étant à base des protéines définies ci-dessus, avec un véhicule pharmaceutique.

Les anticorps formés contre l'adényl cyclase de B.anthraxis donnant lieu à une réaction immunologique croisée avec l'adényl cyclase de B.pertussis, l'invention fournit avantageusement un double vaccin contre les infections provoquées par B.anthraxis et B.pertussis.

On indique ci-après, à titre d'exemple non limitatif, les matériels et les méthodes utilisés pour

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10

cloner et séquencer le gène de l'adényl cyclase de B.anthraxis.

Les figures 1 et 2 auxquelles il est fait référence représentent :

- 5 - la figure 1, la carte de restriction d'un fragment d'ADN d'environ 3,8 kb portant le gène cya de B.anthraxis, et
- la figure 2, les séquences d'acides aminés des adényl cyclases de B.anthraxis (ligne supérieure) et de B.pertussis (ligne inférieure).

10

a) Souches bactériennes et plasmides

On utilise les souches d'E.coli suivantes pour la transformation TP610 (5) et pour la transfection JM105 (6).

15

le plasmide recombinant mis en oeuvre pMMA8812 est un dérivé de pUC8 contenant un fragment EcoRV-PstI de 3,8 kb portant les déterminants pour l'adényl cyclase de B.anthraxis (1). Le fragment de restriction EcoRV-PstI est représenté sur la Figure 1.

20

Le plasmide recombinant pMMA8812 exerce une action de complémentation, activée par la calmoduline, vis-à-vis de la déficience en cyclase d'une souche d'E.coli cya<sup>-</sup>.

b) Milieux et réactifs chimiques

25

On réalise les cultures sur des milieux LB riches de Miller (7). L'ampicilline, lorsqu'elle est utilisée, est ajoutée à raison de 100 microgramme par ml. On utilise les enzymes de restriction ADN T4 ligase et PolIk (Boehringer - Mannheim) et l'ADN T7 polymérase modifiée (Séquenase) commercialisée par USBC. Les oligodéoxy ribonucléotides utilisés comme amorces dans le séquençage d'ADN d'une part et le dATP<sup>35</sup> d'autre part sont tels que commercialisés respectivement par Pharma et par Amersham.

30

35

c) Analyse de la séquence de nucléotides

FEUILLE DE REMPLACEMENT

On utilise des sous-clones dans le vecteur mono-brin M13mp19 (8). Pour engendrer des délétions unidirectionnelles, on a recours au système cyclone (IBI).

La séquence de nucléotides est déterminée selon la méthode de terminaison de chaîne didéoxynucléotide (9) lorsqu'on utilise PolIk ou par une méthode de terminaison de chaîne didéoxynucléotide modifiée, lorsqu'on utilise la Séquenase (10).

On a déterminé la séquence de nucléotides de l'insertion d'ADN de B.anthraxis de pMA8812.

Le fragment de la figure 1 ne comporte qu'un cadre ouvert de lecture de 240C pb. Ce dernier contient 800 codons allant du site considéré comme étant le site d'initiation de la traduction au codon de terminaison TAA.

Le codon considéré comme codon ATG de départ est précédé par un site, du type des sites de liaison aux ribosomes (RBS), dont la séquence GGAGC est complémentaire du 3'OH de l'ARN ribosomal 16S.

La séquence complète de nucléotides du cadre ouvert de lecture est représentée sur la figure 2. On constate que la séquence en aval du site RBS est particulièrement riche en A-T. La séquence d'acides aminés traduite correspond à l'enchaînement II ci-dessus.

Le site de clivage proposé sur la Figure 2 doit être corroboré par des données concernant le résidu N-terminal de l'adényl cyclase. Comme indiqué plus haut, l'adényl cyclase est vraisemblablement synthétisée par B.anthraxis sous forme d'un plus grand précurseur dont la séquence signal est éliminée lors de la sécrétion. Le traitement du précurseur devrait conduire à une protéine mature de  $M_r$  89261.

d) Comparaison des structures primaires des adényl-cyclases de B.anthraxis et de B.pertussis

FEUILLE DE REMPLACEMENT

On a représenté sur la figure 2, la séquence complète du polypeptide de l'adényl cyclase de B.anthraxis (ligne supérieure) et la séquence polypeptidique N-terminale de l'adényl cyclase de B.pertussis (ligne inférieure).

Les astérisques indiquent les acides aminés identiques et les croix des acides aminés de la même classe chimique.

La comparaison de ces séquences montre qu'elles sont dans leur ensemble différentes mais qu'elles présentent des parties de forte ou de plus faible similitude.

On constate, en particulier, une similitude dans un domaine d'environ 400 acides aminés situé chez l'enzyme de B.anthraxis dans la partie centrale et chez celle de B.pertussis dans la partie N-terminale.

Des expériences de délétion in vitro ont montré que la séquence de 450 acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'adényl cyclase de B.pertussis correspond au domaine catalytique activé par la calmoduline, ce qui amène à reconnaître le centre catalytique de l'adényl cyclase de B.anthraxis dans la région allant de l'acide aminé en position 300 à celui en position 683.

La similitude la plus importante correspond au peptide de 24 acides aminés (de la position 342 à la position 365). Cette séquence contient cinq résidus gly et la séquence noyau G --- GKS (AKS chez B.pertussis) que l'on retrouve souvent dans les protéines ayant une affinité pour les nucléotides.

Deux autres régions présentent une similitude plus faible. Elles correspondent aux domaines s'étendant des positions 487 à 501 d'une part et 573 à 594 d'autre part.

Selon les résultats des études effectuées

21

sur cette séquence d'acides aminés l'adényl cyclase de B. anthracis apparaît organisée en domaines fonctionnels.

Au moins trois fonctions peuvent être attribuées à la molécule, à savoir :

- 5 1 - l'interaction avec des cellules eucaryotes. Cette propriété s'exerce par l'intermédiaire de l'antigène protecteur (PA) qui se fixe tout d'abord aux cellules sensibles, puis interagit avec l'adényl cyclase,
- 2 - l'internalisation,
- 10 3 - la fixation à la calmoduline et l'activation de la cyclase.

La partie centrale de la molécule (région allant des positions 350 à 390) est attribuée au domaine dépendant de la calmoduline.

15

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Mock et al, Gene 1988, 64, 277-284
- 2) Vodkin et Leppla, Cell 1983, 34:693-697
- 20 3) Robertson et Leppla, Gene 1986, 44:71-78
- 4) Tippetts et Robertson, J. of Bact. 1988, vol 70, n° 5, 2263-2266
- 5) Hedegaard et Danchin, Mol. Gen. Gen. 201 (1985), 38-42
- 25 6) Yanisch-Perron et al, Gene 33 (1985), 103-119
- 7) Miller, Cold Spring harbor, NY, 1972
- 8) Norrander et al, Gene 26 (1983), 101-106
- 9) Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467
- 30 10) Tabor et Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 4767-4771

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

**REVENDICATIONS**

1. Séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle est constituée par au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité adényl cyclase telle qu'exprimée par B.anthraxis.

2. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle est capable de s'hybrider avec des gènes codant pour une adényl cyclase de B.anthraxis.

3. Séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle porte l'information pour l'expression d'une adényl cyclase, ou de fragments de cette dernières capables de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés respectivement contre une adényl cyclase de B.anthraxis ou de B.pertussis, ou contre des fragments d'une telle adényl cyclase.

4. Séquence de nucléotides recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence selon l'une des revendications 1 à 3, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

5. Séquence de nucléotides recombinante, associée à un promoteur et à un opérateur permettant de contrôler la transcription, et à une séquence signal permettant la sécrétion de la protéine dans l'espace périplasmique (gram -) ou dans le milieu extérieur.

6. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle est capable de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence présentant l'enchaînement de nucléotides (I) suivant :



23  
I a

GAATTCAAAA TCGGACTTAG AAATACACAT ATAGAAATAA ACAACCTAAT CCATGTCAC  
-400  
GTACCGTTTT TTTACTAAAT AAACGAAATC AGTGTAATAA TGAACAGCTG AACTTTATCA  
ACTTAGAATC TCTTTTTTTA CTTTAAATGC CTAGCTGTTT TTTCTAATGT TTGTATTTCT  
-300  
AAATATATTT AAATATGAAT TGTAGCTGTG TGCCAAGAGT TATAATTAAT TTAAATAAGA  
-200  
TTATATTTGT AAATAAAAT GTATTTAAC ATGTAGAATA AAGAGATTTT TAGTTTTATT  
AACAGGATGA AAATCCATAA AACCGTAAAT GTGATTTCTA AATTAGTTTA AAATAAAAAA  
-100  
CAAGGATTTG CTCAGACTTG AGATGAATAT CTAAATATCA AGAACCCAAA GGAGGTTTAA  
GAATGACTAG AAATAAATTT ATACCTAATA AGTTTAGTAT TATATCCTTT TCAGTATTAC  
20  
TATTTGCTAT ATCTCCTCA CAGGCTATAG AAGTAAATGC TATGAATGAA CATTACACTG  
40 100  
AGAGTGATAT TAAAGAAAC CATAAACTG AAAAAATAA AACTGAAAAA GAAAAATTA  
60  
AAGACAGTAT TAATACTTA GTTAAACAG AATTEACCA TGAACCTTTA GATAAAATAC  
80 200  
AGCAGACACA AGACTTATA AAAAAGATAC CTAAGGATGT ACTTGAAAT TATAGTGAA  
100  
TAGGAGGAGA AATCTATTTT ACAGATATAG ATTEAGTAGA ACATAAGGAG TTACAAGATT  
120 300  
TAAGTGAAGA AGAGAAAAAT AGTATGAATA GTAGAGGTGA AAAAGTTCCG TTTGCATCCC  
140 400  
GTTTTGTATT TGAAAGAAA AGGGAAACAC CTAAATTAAT TATAATATC AAAGATTATG  
160  
CAATTAATAG TGAACAAAGT AAAGAAGTAT ATTATGAAAT TGGAAAGGGG ATTTCTCTTG  
180 500  
ATATTATAAG TAAGGATAA TCTCTAGATC CAGAGTTTTT AAATTAAT TAAAGTTTTA  
200  
GCGATGATAG TGATAGTAGC GACCTTTTAT TTAGTCAAAA ATTTAAAGAG AAGCTAGAA  
220 600  
TGAATAATAA AAGTATAGAT ATAAATTTTA TAAAGAAAA TTTAACTGAA TTTCAGCATG  
240 700  
CGTTTTCTTT AGCGTTTTCT TATTATTTTG CACCTGACCA TAGAACGGTA TTAGAGTTAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

24  
I b

260 ATGCCCCCGA CATGTTTGAG TATATGAATA AGTTAGAAA ACCCGGATTT GAGAAAAATA  
800

280 GTGAAAGTTT GAAGAAAGAA GGTGTGGAAA AACATAGGAT TGATGTGCTG AAAGGAGAAA

300 AAGCACTTAA ACCTTCAGGT TTAGTACCAG AACATGCGA TGCTTTTAAA AAAATTCCTA  
900

320 GAGAAATTAA TACATATATT CTTTTTAGCC CTGTTAATAA GTTAGCTACA AACCTTATTA

340 AAAGTGGTGT CCTACAAAG GGATTGAATG TTCATGGAAA GAGTTCCGAT TCGGGCCCTG  
1000

360 TAGCTGGATA CATACCATTT GATCAAGATT TATCTAAGAA GCATGGTCAA CAATTAGCTG  
1100

380 TCGAGAAAGG AAATTTAGAA AATAAAAAAT CAATTACAGA GCATGAAGGT GAAATAGCTA

400 AAATACCATT AAGTTAGAC CATTTAAGAA TAGAAGAGTT AAAGGAAAAT GGGATAATTT  
1200

420 TGAAGCGTAA AAAGAAATT GATAATGGTA AAAATATTA TTTGTTAGAA TCGAATAATC  
1300

440 AGGTATATGA ATTTAGAATT ACCGATGAAA ACAACGAAGT ACAATACAGG ACAAAAGAG

460 GTAAAATTAC TGTTTTAGCG GAAAAATTC AATCGAGAAA TATAGAAGTG ATGCTTAATA  
1400

480 ATGTAGAAGG GGTCTTGAAG CCGTTAACAG CTGACTATGA TTAATTTCCA CTTCGCCCAA

500 GTTTAACAGA AATAAAAAAA CAATACCAC AAAAGGAATG GGAATAAGTA GTTAACAGCC  
1500

520 CAAATTCATT AGAAAAGCAA AAAGGTCTTA CTAATTTATT GATTAAATAT GGAATTCAGA  
1600

540 GGAACCGGGA TTCAACTAAG GGAATTTAT CAAATTCGA AAACAAATG CTGATCGTT

560 TGAATGAAGC AGTCAAATAT ACAGGATATA CAGGGGGGGA TGTGTTAAC CATGCGACAG  
1700

580 ACCAAGATAA TGAAGATTT CCTGAAAAAG ATAGGAAAT TTTTATAATT AATCCAGAG

600 GTGAATTTAT ATTAATAA AATTCGGAGA TGACAGGTAG ATTTATAGAA AAAACATTA  
1800

620 CCGGAAAAGA TTAATTTAT TATTTAACG GTTCTTATAA TAAATAGCT CCTGGTAAAT  
1900

640 AAGCTTATAT TGAGTGGACT GATCCGATTA CAAACCCAA AATAAATAGC ATCCCTAGCT

25  
I c

660 CAGCAGAGTT TATAAAAAAC TTATCCAGTA TCAGAAGATC TTCAAATGTA GGAGTTTATA  
2000

680 AAGATAGTGG CGACAAAGAC GAATTTGCAA AAAAAGAAAG CGTGAAAAAA ATTGCAGGAT

700 ATTTGTCAGA CTATTACAAT TCAGCAAATC ATATTTTTC TCAGGAAAAA AAGCGTAAAA  
2100

720 TATCAATATT TCGTGAATC CAAGCCTATA ATGAAATTGA AAATGTTCTA AAATCTAAAC  
2200

740 AAATAGCACC AGAATACAAA AATTATTTTC AATATTTAAA GGAAAGGATT ACCAATCAAG

760 TTCAATTGCT TCTAACACAT CAAAAATCTA ATATTGAATT TAAATTATTG TATAACAAT  
2300

780 TAACTTTAC AGAAAATGAA ACGGATAATT TTGAGGTCTT CAAAAAATT ATTGATGAAA

800 AATAAATATA TATAATTGTT TTTCTGAAA TTCATCATT TAAAGAAGAC ACTAGGAATT  
2400

AAATAGATGT ATTGAATAGT TATAGTAATG GTCTTGATG GACATACCGC TTATACTTTG  
2500

GGAGGTAGTA GATATTAAAC AACATATAGC AAATGAACTG GATGTAGATC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

26

ou l'enchaînement des nucléotides complémentaires de la séquence (I).

5 7. Séquence de nucléotides portant l'information génétique correspondant à l'expression d'au moins une partie d'une adényl cyclase telle qu'exprimée par B.anthraxis, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie de l'enchaînement (I) selon la revendication 6.

10 8. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle porte l'information correspondant à l'expression d'au moins une partie de la séquence en acides aminés (II) suivante :

15

20

25

30

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

27

IIa

M T R N K F I P N K F S I I S F S V L  
20 L F A I S S S Q A I E V N A N N E H Y T  
40 E S D I K R N H K T E K N K T E K E K F  
60 K D S I N N L V K T E F T N E T L D K I  
80 Q Q T Q D L L K K I P K D V L E I Y S E  
100 L G G E I Y F T D I D L V E H K E L Q D  
120 L S E E E K N S M N S R G E K V P F A S  
140 R F V F E K K R E T P K L I I N I K D Y  
160 A I N S E Q S K E V Y Y E I G K G I S L  
180 D I I S K D K S L D P E F L N L I K S L  
200 S D D S D S S D L L F S Q K F K E K L E

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

28

IIb

220 L N N K S I D I N F I K E N L T E F Q H  
240 A F S L A F S Y Y F A P D H R T V L E L  
260 Y A P D M F E Y M N K L E K G G F E K I  
280 S E S L K K E G V E K D R I D V L K G E  
300 K A L K A S G L V P E H A D A F K K I A  
320 R E L N T Y I L F R P V N K L A T N L I  
340 K S G V A T K G L N V H G K S S D W G P  
360 V A G Y I P F D Q D L S K K H G Q Q L A  
380 V E K G N L E N K K S I T E H E G E I G  
400 K I P L K L D H L R I E E L K E N G I I  
420 L K G K K E I D N G K K Y Y L L E S N N  
440 Q V Y E F R I S D E N N E V Q Y K T K E  
460 G K I T V L G E K F N W R N I E V M A K  
480 N V E G V L K P L T A D Y D L F A L A P  
500 S L T E I K K Q I P Q K E W D K V V N T

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

29

IIc

520 P N S L E K Q K G L T N L L I K Y G I E  
540 R K P D S T K G T L S N W Q K Q M L D R  
560 L N E A V K Y T G Y T G G D V V N H G T  
580 E Q D N E E F P E K D N E I F I I N P E  
600 G E F I L T K N W E M T G R F I E K N I  
620 T G K D Y L Y Y F N R S Y N K I A P G N  
640 K A Y I E W T D P I T K A K I N T I P T  
660 S A E F I K N L S S I R R S S N V G V Y  
680 K D S G D K D E F A K K E S V K K I A G  
700 Y L S D Y Y N S A N H I F S Q E K K R K  
720 I S I F R G I Q A Y N E I E N V L K S K  
740 Q I A P E Y K N Y F Q Y L K E R I T N Q  
760 V Q L L L T H Q K S N I E F K L L Y K Q  
780 L N F T E N E T D N F E V F Q K I I D E  
800 K

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

## 30

9. Protéine à activité adényl cyclase du type de celle exprimée par B. anthracis et ses fragments peptidiques, correspondant selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides de l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 8.

10. Protéine selon la revendication 9, correspondant à l'enchaînement II d'acides aminés selon la revendication 8.

11. Protéine selon la revendication 9 ou  
10 10, caractérisée en ce qu'elle comporte avec l'adényl cyclase de B. pertussis une similitude forte pour les régions allant des positions 342 à 365, et une similitude plus faible pour les domaines s'étendant des positions 487 à 501 d'une part et 573 à 594 d'autre  
15 part.

12. Protéine constituée par ou comprenant les domaines allant de la position 300 à la position 683 dans l'enchaînement II selon la revendication 8, correspondant au centre catalytique de l'adényl cyclase de B. pertussis ou au domaine allant de la position 350 à  
20 390 de l'enchaînement II, correspondant au domaine dépendant de la calmoduline.

13. Protéine à activité adényl cyclase selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce qu'elle donne lieu à une réaction  
25 immunologique croisée avec des anticorps dirigés contre l'adényl cyclase de cerveau de rat ou encore l'adényl cyclase de B. pertussis.

14. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre tout ou partie  
30 de la protéine, ou de ses fragments, selon l'une quelconque des revendications 9 à 13.

15. Sonde de détection caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie des séquences de  
35 nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1



à 8.

16. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection du site de liaison à la calmoduline dans des gènes codant pour une adénylcyclase, caractérisé en qu'il comprend :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 15,
- avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde sus-mentionnée,
- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

17. Vaccins capables d'induire une protection chez l'homme et l'animal contre une infection provoquée par B.anthraxis et le cas échéant B.pertussis, caractérisés en ce qu'il s'agit de vaccins moléculaires renfermant une protéine selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, en association avec un véhicule pharmaceutique.

25

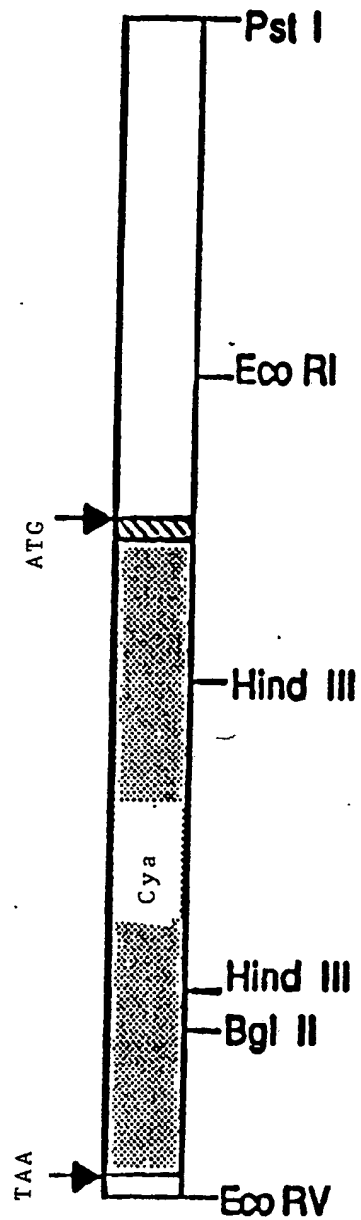
30

35

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

1/4

FIGURE 1



2 / 4

**FIGURE 2A**

[illegible]

## FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/4  
FIGURE 2B

370	380	390	400	410
AGVIPDQDLSKKHGQQLAVEKGNLE	NKKSITEHEGEIGKIPLKLDHLRIEELKENGJIL			
.... + + + +	.. + + + +			
AGVIPVNPNSLKFGRAPVIARADNDVNSSLAH-GHTA-VDLTISKERLDVLRQAGLVT				
80	90	100	110	120
430	440	450	460	470
KGKKEIDNGKKYVLLSNNQVVEFRISDENNE---	VQYKTKEGKITVLGEKFNWRNIEVM			
.. + + + +	.. + + + +			
-GMADGVVASHHAGVEQ----	FEFRVKETSDGRYAVQYRRKG-----	GDDF-----	EAV	170
140	150	160		
480	490	500	510	520
AKNVEGVLPKPLTADVDLFALAPSLTEIKKQIPQKEWD-----	KVVNTIPNSLEKQKV-			
+ + + + +	+ + + + +			
KVIGNAAGIPLTADIDMFAIMPHLSNFRDSARSSVTSGDSVTDYLARTTRAASEATGGLD				
180	190	200	210	220
530	540	550	560	570
----TNLLIKV--GIE-RKPDSTKGTLSNWQKQM----	LORLNEAV-KYTGVTGGDVVNHGT			
.. + + + +	.. + + + +			
RERIDLLWKIARGTEARRQFRYDGDGM-NI	GVITDTELEVRNALNRRRAHAVGAQDVVQHGT			
240	250	260	270	280
				290

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4/4

FIGURE 2C

580                    590                    600                    610                    620                    630  
 EQDNEEFPEKONEIFIINPEGEF-ILTKNWEMTGRFIEKNITGKDYLVFNRSYNKIAPG  
 ••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +•••••  
 EQNHP-FPEADEKIFVVSATGESQMLTRG-QLKE-YIGQQR-CEGYVFFVENRAY-GVA-G  
 310                    320                    330                    340                    350  
  
 640                    650                    660                    670                    680                    690  
 NKAYIE---WIDP-ITKAKINTIPTSAEFIKNLSSIRSSNMGVVK-DSGDKDEFACKES  
 ••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +•••••  
 -KSLFDDGLGAAPGVPSGRSKFSPDVLETVPASPLRRPSLGAVRQDSC-YDSLOGVGS  
 360                    370                    380                    390                    400                    410  
  
 700                    710                    720                    730                    740                    750  
 VKKIAGVLSOVYNSANHIFSQEKRRKISIFRGIQAYNEIENVLKSKQIAPEVKHYFQYVK  
 ••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +•••••  
 RSFSLGEVSDMAAVEAAELEMTRQVLHAGARQDDAEPCVSGASAHWGQRALQGAQAVAAA  
 420                    430                    440                    450                    460                    470  
  
 760                    770                    780                    790  
 ERITNQVQLLLTHQKSNIEFKLLYKQLNFTEETDNFEVFQKIIDEK  
 ••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +••••• +•••••  
 QRLVHAIALMTQFGRAGSTNTPQEAASLSAAVFLGEASSAVAETVSGFFRGSSRWAGGF

FEUILLE DE REMPLACEMENT

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl <sup>5</sup> : C 12 N 15/31, 15/60, 9/88, A 61 K 39/07, C 12 P 21/08, C 12 Q 1/68		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl <sup>5</sup>	C 12 N, A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *</b>		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
X	Gene, Vol. 64; No. 2, 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), M. Mock et al.: "Cloning and expression of the calmodulin-sensitive Bacillus anthracis adenylate cyclase in Escherichia coli" pages 277-284, see the whole article cited in the application	1-4, 9, 13
X	Journal of Bacteriology, Vol. 170, No. 5, May 1988, American Society for Microbiology, M.T. Tippetts et al.: "Molecular cloning and expression of the Bacillus anthracis edema factor toxin gene: a calmodulin-dependent adenylate cyclase", pages 2263-2266 see the whole article cited in the application	1, 2, 4, 9
X	The FASEB Journal, Vol. 2, No. 6, 25 March 1988, 72nd Annual Meeting Federation of American Societies for Experimental Biology, 1-5 May 1988, D. Robertson et al.: "Biochemical analysis of the Bacillus anthracis edema factor gene: a calmodulin-dependent adenylate cyclase", abstract No. 8451, see abstract	1, 2, 9
A	FR, A, 2606789 (INSTITUT PASTEUR) 20 May 1988, see claims 1, 22, 23	14 ./.
<p>* Special categories of cited documents: **</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on novelty claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
15 February 1990 (15.02.90)		22 March 1990 (22.03.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	Gene, Vol.71, No.2, November 1988, Elsevier Science Publishers B.V.(Biomedical Division), (Amsterdam,NL), V.Escuyer et al.: "Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases", pages 293-298 see the whole article	1-13
P,X	Gene, Vol. 73, December 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam,NL), D.L.Robertson et al.: "Nucleotide sequence of the Bacillus anthracis edema factor gene (cya): a calmodulin-dependent adenylate cyclase", pages 363-371 see the whole article	1-13

FR 8900556  
SA 32423

**For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82**



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 89/00556

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>1</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB 5 C 12 N 15/31, 15/60, 9/88, A 61 K 39/07, C 12 P 21/08, CIB : C 12 Q 1/68		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>5</sup>	C 12 N, A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>6</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	Gene, volume 64, no. 2, 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), M. Mock et al.: "Cloning and expression of the calmodulin-sensitive Bacillus anthracis adenylate cyclase in Escherichia coli", pages 277-284 voir l'article en entier cité dans la demande	1-4,9,13
X	Journal of Bacteriology, volume 170, no. 5, mai 1988, American Society for Microbiology, M.T. Tippetts et al.: "Molecular cloning and expression of the Bacillus anthracis edema factor toxin gene: a calmodulin-dependent adenylate cyclase", pages 2263-2266 voir l'article en entier cité dans la demande	1,2,4,9
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>14</sup> Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  15 février 1990	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  22 MARS 1990	
Administration chargée de la recherche internationale  OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé  T.K. WILLIS	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
X	The FASEB Journal, volume 2, no. 6, 25 mars 1988, 72nd Annual Meeting Federation of American Societies for Experimental Biology, 1-5 mai 1988, D. Robertson et al.: "Biochemical analysis of the Bacillus anthracis edema factor gene: a calmodulin- dependent adenylate cyclase", résumé no. 8451 voir résumé --	1,2,9
A	FR, A, 2606789 (INSTITUT PASTEUR) 20 mai 1988 voir revendications 1,22,23 --	14
P,X	Gene, volume 71, no. 2, novembre 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), V. Escuyer et al.: "Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases", pages 293-298 voir l'article en entier --	1-13
P,X	Gene, volume 73, décembre 1988, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), D.L. Robertson et al.: "Nucleotide sequence of the Bacillus anthracis edema factor gene (cya): a calmodulin-dependent adenylate cyclase", pages 363-371 voir l'article en entier -----	1-13

FR 8900556  
SA 32423

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2606789	20-05-88	EP-A- 0272174 JP-A- 63267274	22-06-88 04-11-88
-----			

**Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**